

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590554

研究課題名(和文) 自然免疫を抑制するウイルス蛋白質の構造と作用機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of structure and function of viral proteins that suppress innate immunity

研究代表者

坂口 剛正 (Sakaguchi, Takemasa)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：70196070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：センダイウイルスのアクセサリ蛋白質Cが転写因子STAT1の機能を阻害する機構を研究した。STAT1のN末端とC蛋白質のC端側(Y3)の複合体を結晶化して立体構造を決定した。これからY3蛋白質と全長STAT1の結合をモデリングし、他の実験結果から、インターフェロン 刺激時に、Y3結合STAT1はリン酸化された平行型二量体を形成すると考えられた。全長C蛋白質の場合には、さらにC結合STAT1が高分子量複合体を形成してSTAT1活性化を阻害すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism by which an accessory protein of Sendai virus, the C protein, inhibits the STAT1 function. We determined the crystal structure of STAT1ND associated with the C-terminal half of the C protein (Y3). Molecular modeling suggested that a parallel form of the STAT1 dimer can bind two Y3 molecules. Kinetic analysis demonstrated anti-cooperative binding of two Y3 molecules with the STAT1 dimer, thereby implying that the second Y3 molecule can only target the STAT1 dimer in a parallel form. STAT1 with excess amounts of Y3 was prone to be phosphorylated at Tyr705 as shown by an in vitro dephosphorylation assay. Since it is reported that the full-length C protein induces a high molecular weight complex of pY-STAT1, the results of this study suggest that the C protein induces complex formation of the parallel form of pY-STAT1, leading to inhibition of transcription.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス アクセサリ蛋白質 自然免疫 インターフェロン 蛋白質結晶化 蛋白質構造解析 共結晶化 STAT1

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は感染早期の病原微生物の排除に重要な役割を果たしている。ウイルス感染に対する自然免疫においては、インターフェロンが重要であるが、ウイルスがインターフェロンの誘導や作用を阻止していることがわかってきた。パラミクソウイルスは一本鎖陰性鎖の RNA ウイルスであり、これにはニパウイルス・麻疹ウイルス・RS ウイルスなどのヒトの重要な感染症の原因ウイルスが含まれている。セндаイウイルス (SeV) は、パラミクソウイルス科のプロトタイプであり、マウスなどの齧歯類に呼吸器疾患を引き起こす。SeV では、ウイルスのポリメラーゼ・サブユニットである P 蛋白質の mRNA から、P とはシフトした翻訳フレームを用いて C 蛋白質、また P mRNA の特定部位に RNA editing によって G 塩基が挿入されることで途中からフレームがシフトした V 蛋白質の 2 種類の付加的な蛋白質 (アクセサリ蛋白質) が合成される。

C 蛋白質欠損ウイルスの研究から、SeV の C 蛋白質は宿主のインターフェロン系の阻害を起こすことが知られている。特に転写因子 STAT1 に結合し、インターフェロン α/β あるいはインターフェロン γ からのシグナル伝達を阻害することが明らかになっている。C 蛋白質と STAT1 の結合は、そのための重要な鍵となる。

V 蛋白質は、SeV ではインターフェロン関連転写因子 IRF3 を阻害してインターフェロン β の誘導を抑制することが知られている。従来から IRF3 の上流の RNA ウイルスセンサーの MDA5 が、V 蛋白質によって阻害されることが知られていたが、最近我々は、V 蛋白質が IRF3 と直接に結合して阻害することを示した。

このように自然免疫阻害の機構について研究が進んできたが、その分子的基盤の詳細は不明である。蛋白質結晶構造学を活かして、アクセサリ蛋白質の立体構造から作用機構の課題にアプローチすることを着想した。

2. 研究の目的

セндаイウイルスのアクセサリ蛋白質 (V, C) の結晶化と立体構造の解明を行い、その相互作用の分子機構を解析し、自然免疫からの回避機構を明らかにすることが本研究の目的である。

(1) C 蛋白質と STAT1、および V 蛋白質と IRF3 の相互作用を、欠失蛋白質を作製して解析する。これによって、結合のための最小ドメインを同定し、蛋白質結晶化のためのポリペプチド調製を行う。

(2) 蛋白質結晶を得て構造解析を行う。

(3) C 蛋白質の立体構造の特徴を明らかにする。さらに STAT1 との結合の様式を、組換え蛋白質を用いて解明する。他の蛋白質との結合についても結合様式を推測する。

(4) V 蛋白質の構造的特性、IRF3 との結合様

式を明らかにする。

(5) アクセサリ蛋白質に変異をもつ組換えウイルスを作製し、SeV ベクターへの応用のための予備実験を行う。

3. 研究の方法

(1) アクセサリ蛋白質と宿主因子との相互作用の解析とポリペプチドの調製

C 蛋白質と STAT1、および V 蛋白質と IRF3 の相互作用を、欠失変異体を作製して解析する。結合する最小のドメインを同定して、蛋白質結晶化のためのポリペプチドを、大腸菌を用いて発現・精製する。

C 蛋白質に関しては、STAT1 との結合に関与するとされる C 末端側の欠失蛋白質を検討する。構造解析に適した結晶が得られない時は、STAT1 の結合ドメインを発現させ、C 蛋白質と複合体を作らせて共結晶化を試みる。

V 蛋白質に関して構造解析に適した結晶が得られない時は、N 末端あるいは C 末端アミノ酸部分を欠失させた V 蛋白質変異体、もしくは 50% 程度のアミノ酸配列相同性をもったヒトパラインフルエンザウイルス 1 型の相当する蛋白質から結晶を取得する。

(2) 立体構造解明による蛋白質機能、相互作用の解析

上記ポリペプチドから取得した結晶を用い、立体構造を解明する。SPRING-8 (理化学研究所、兵庫県佐用郡) などの大型放射光施設を利用する。

C 蛋白質の結晶構造を得て、その構造学的な特徴を明らかにする。さらに STAT1 との結合の性質についてその性質を明らかにする。また結合に関わることが予測されるアミノ酸残基に変異を導入し、親和性とインターフェロン・シグナル伝達抑制能がいかに変化するかを検討する。V 蛋白質についても同様に解析する。

(3) 立体構造に基づく自然免疫抑制機構の解析

C 蛋白質と STAT1 の結合の解離定数を測定する。結合によって、全長 STAT1 の構造がどのように変化するかをモデリングし、リン酸化の変化、DNA 結合能の変化、転写活性化抑制について実験し、インターフェロン γ による STAT1 ダイマーの活性化が、C 蛋白質によって抑制される分子機構を明らかにする。インターフェロン α/β による STAT1/STAT2 ヘテロダイマーの活性化抑制についても検討する。

V 蛋白質についても同様な実験を行い、IRF3 活性化の抑制について検討する。

4. 研究成果

(1) C 蛋白質 C 末端側半分の Y3 蛋白質 (105 残基) と STAT1 N 末端ドメイン (126 残基) の複合体の結晶を得ることに成功し、2.0Å の分解能で立体構造を決定した (図 1)。STAT1

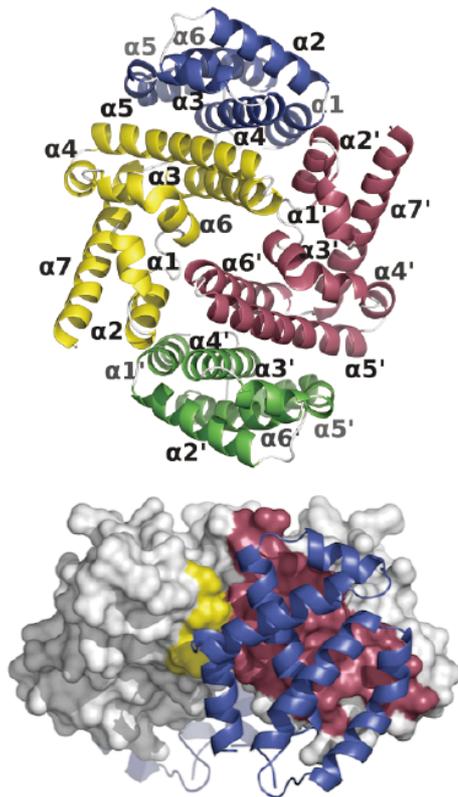


図1 STAT1 N 末端ドメインと Y3 蛋白質複合体の構造

N 末端ドメインの二量体の隙間に、両方に結合するように Y3 が対称的に両側から 1 分子ずつ結合していた。Y3 は α ヘリックス 4 本からなる新規の構造であった。結合面の解析から、C 蛋白質の 150 位メチオニン、154 位アルギニンが結合に重要であると考えられ、これらをそれぞれアラニンなどに変えた変異体は結合能が低下しており、インターフェロンのシグナル伝達の抑制能が消失していた。

次に全長 STAT1 が Y3 蛋白質結合によって、どのような構造をとるかをモデリングした。STAT1 は N 末端ドメインと、それ以外のコアフラグメントがリンカーでつながっており、N 末端ドメイン同士で二量体を形成し、リンカーの部分で回転することで、いろいろな構造をとる。コアフラグメントが平行になる並行型、180 度互い違いになる非並行型が主たる構造である。

STAT1 は通常、705 位チロシンがリン酸化されない非活性型のときには、非並行型で細胞質に存在している。インターフェロン・シグナル伝達で STAT1 がリン酸化されると並行型になり、さらに DNA 結合型になり、核内に輸送されて標的 DNA 配列 (GAS 配列) に結合して転写を活性化する。

Y3 が過剰に存在するときには、Y3 は、並行型の STAT1 二量体に 2 分子結合する。これ以外の構造はとりえない。大腸菌から精製した蛋白質を用いて、試験管内で FRET を用

いて結合動態を解析し、解離定数を測定したところ、STAT1 二量体への最初の Y3 分子の結合よりも、2 分子目の結合が起こりにくく、これは並行型にしか結合できないことを表していると考えられた。

並行型ではリン酸化が進行するので、結果的に細胞内にリン酸化された STAT1 二量体が蓄積すると考えられた。このことを Y3 存在下の試験管内脱リン酸化反応で調べたところ、確かに過剰量の Y3 存在下ではリン酸化が促進するという結果を得られた。それでは、この Y3-リン酸化 STAT1 複合体が転写を活性化できるかを検討したところ、レポーターアッセイでほぼ半分程度に抑制されていた。ゲルシフトアッセイによって、この Y3-リン酸化 STAT1 複合体は標的 DNA に結合できることが示され、さらにおそらく STAT1 N 末端を介する、二量体と二量体による四量体になっていると推測された。

Y3 では部分的な抑制しかおこらなかった。それでは全長の C 蛋白質ではどうかというと、この場合にはシグナル伝達はほぼ完全に抑制された。Y3 にはない C 蛋白質の N 末端側半分があると、蛋白質は重合あるいは凝集することが示されており、実際に Y3 の代わりに C 蛋白質の存在下では、STAT1 二量体は標的 DNA への結合能を欠くことが示されている。

以上から、C 蛋白質による STAT1 二量体 (インターフェロン γ 経路) の阻害は、次のように説明される (図 2)。C 蛋白質があると、STAT1 二量体平行型には 2 分子結合し、STAT1 二量体非平行型には 1 分子結合したあと、効率は低い但最终的に平行型に誘導しながら 2 分子結合する (図中の点線の矢印)。この C 蛋白質が結合した平行型二量体 (図中、赤四角) が C 蛋白質の働きで重合して標的 DNA へは結合できなくなり、転写活性化がおきなくなる。

また、インターフェロン α/β 経路の STAT1/STAT2 ヘテロ二量体については、C 蛋白質がその中の STAT1 を介して 1 分子結合し、非並行型に固定されるためにリン酸化が起こりにくくなると推測された。

パラミクソウイルスの C 蛋白質の立体構造を明らかにしたのは、本研究が初めての報告である (論文投稿中)。C 蛋白質による自然免疫回避機構について、詳細な分子メカニズムが明らかになった。このことはウイルス学的にも特記すべきことであり、さらに STAT1 の活性化と阻害機構の研究にも資するものである。

C 蛋白質は STAT1 の他にも、ALIX、GRB2 などの多くの宿主因子、ウイルス RNA ポリメラーゼ L 蛋白質、ウイルス RNA とも結合することが示されている。小田らはすでに C 蛋白質と ALIX との結合複合体の立体構造を解明し、C 蛋白質上で、STAT1 とは異なる部位に結合することを示している (学会発表)。

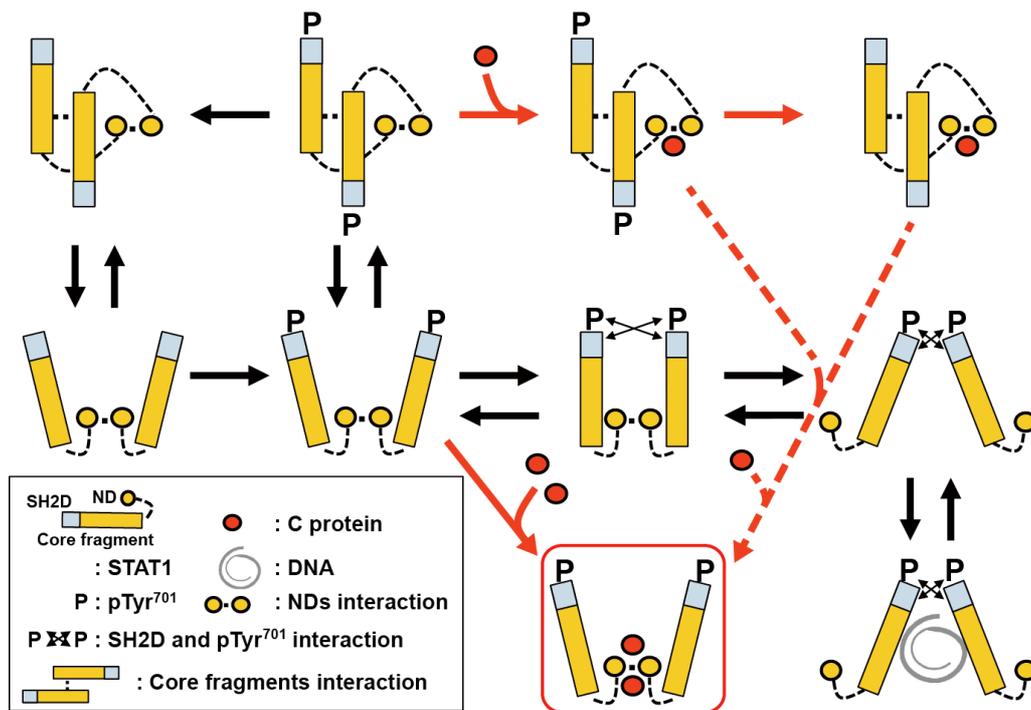


図2 C蛋白質結合によるSTAT1二量体の構造変換

これらの結合の解析によってアクセサリ蛋白質が複数のポイントから複合的に働いていることが明らかになると期待される。

さらにSTAT1ともっとも近縁なSTAT3と結合するようにC蛋白質を改変することで、STAT3阻害センダイウイルスを作製する研究を開始している。STAT3は一部の腫瘍で活性化されており、一部の抗がん剤はSTAT3を抑制することで効果を発揮することが知られている。このようなSTAT3阻害ウイルスは、腫瘍に対する遺伝子治療の有用なツールになると考えられる。今後は、今回結晶を得ることができなかったV蛋白質と宿主因子の複合体についてもさらに研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Irie, T., Okamoto, I., Yoshida, A., Nagai, Y., Sakaguchi, T., Sendai virus C proteins regulate viral genome and antigenome synthesis to dictate the negative genome polarity, *Journal of Virology*, 査読有, Vol. 88, No. 1, 2014, pp. 690-698.
- ② Irie, T., Yoshida, A., Sakaguchi, T., Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization, *PLoS One*, Vol. 8, No. 8, 2013, e73740.

- ③ Yoshida, A., Sakaguchi, T., Irie, T., Passage of a Sendai virus recombinant in embryonated chicken eggs leads to markedly rapid accumulation of U-to-C transitions in a limited region of the viral genome. *PLoS One*, Vol. 7, No. 11, 2012, e49968.

- ④ Irie, T., Kiyotani, K., Igarashi, T., Yoshida, A., Sakaguchi, T. Inhibition of interferon regulatory factor-3 activation by paramyxovirus V protein, *Journal of Virology*, Vol. 86, No. 13, 2012, pp. 7136-7145.

〔学会発表〕(計11件)

- ①小田康祐、センダイウイルスCタンパク質とESCRT関連因子Alixの結合様式の解析、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
- ②Sakaguchi, T., Stress granule-like structures are not involved in recognition of Sendai virus infection, XVI International Congress of Virology, 2014年7月26日、Montreal (Canada)
- ③坂口剛正、ウイルスによる自然免疫抑制の構造学的解析、平成26年度中四国乳酸菌研究会総会および研究発表会、2014年5月16日、ホテルグランヴィア岡山(岡山県岡山市)
- ④小田康祐、インターフェロン応答を阻害するセンダイウイルスCタンパク質の構造生物学的解析、Third Negative Strand Virus-Japan Symposium in Okinawa, 2014年1月13日、ラ

グナガーデンホテル（沖縄県宜野湾市）

⑤小田康祐、センダイウイルスCタンパク質と宿主転写因子STAT1の複合体構造、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）

⑥小田康祐、自然免疫の抑制に関わるセンダイウイルスCタンパク質と宿主転写因子STAT1の構造生物学的解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

⑦小田康祐、センダイウイルスCタンパク質と転写因子STAT1の相互作用の構造学的解析、第28回中国四国ウイルス研究会、2013年6月22日、広島大学医学部広仁会館（広島県広島市）

⑧Yoshida, A., Different production of viral RNA species between Sendai virus strains causes their remarkable difference in IFN inducibility, Negative-strand virus meeting 2013, 2013年7月16日、Granada (Spain).

⑨吉田明日香、センダイウイルスC蛋白質欠損ウイルスの欠損復帰メカニズム、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日、グランキューブ大阪（大阪府大阪市）

⑩吉田明日香、The accessory C proteins of Sendai virus are involved in triggering IFN- β production, The 11th Awaji international forum on Infection and Immunity, 2012年9月11日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）

⑪吉田明日香、インターフェロン誘導性及びヌクレオカプシド構造におけるセンダイウイルスC蛋白質の関与、第27回中国四国ウイルス研究会、2012年6月23日、米子コンベンションセンター（鳥取県米子市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂口 剛正 (SAKAGUCHI TAKEMASA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授

研究者番号：70196070

(2)研究分担者

小田 康祐 (ODA KOSUKE)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教

研究者番号：60571255

入江 崇 (IRIE TAKASHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・

准教授

研究者番号：70419498